

DOI: 10. 13595/j. cnki. issn1000-0720. 2021. 020304

基于大孔树脂与制备液相色谱技术快速分离野地瓜茎中的绿原酸

刘永玲^{1,2}, 赵治兵^{1,2}, 马凤伟¹, 陈涛³, 刘元凤¹, 谢国芳^{*1,2}

(1. 贵阳学院食品与制药工程学院, 贵阳 550005; 2. 贵州省果品加工工程技术研究中心, 贵阳 550005; 3. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008)

摘要: 建立了基于大孔吸附树脂快速富集, 制备高效液相色谱高效分离野地瓜茎中绿原酸的制备方法: AB-8, D101, HPD600, CN206 和 NKA-II 5 种树脂中, 经静态吸附-解吸附试验发现 NKA-II 型大孔树脂对目标化合物具有较好的吸附率和解析率; 采用 NKA-II 型大孔树脂, 经 4 倍柱体积 (bed volume, BV) 5% (V/V) 乙醇除杂后, 用 7 BV 10% (V/V) 乙醇洗脱得到目标化合物组分, HPLC 分析目标化合物的峰面积比达到 80.8%; 由制备高效液相色谱对目标化合物做进一步纯化并开发了重复进样分离模式, 提高了分离效率, 经纯化后目标化合物纯度达到 98.6%; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 鉴定目标化合物为绿原酸。该方法适合于野地瓜中绿原酸化合物的大规模制备。

关键词: 野地瓜茎; 绿原酸; 快速分离; 大孔吸附树脂; 制备型高效液相色谱
中图分类号: O652.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2021)06-0692-05

Rapid separation of chlorogenic acid from the stems of *Ficus tikoua* Bur. by macroporous resin and preparative liquid chromatography

LIU Yongling^{1,2}, ZHAO Zhibing^{1,2}, MA Fengwei¹, CHEN Tao³, LIU Yuanfeng¹, XIE Guofang^{*1,2} (1. Food and Pharmaceutical Engineering Institute, Guiyang University, Guiyang 550005; 2. Guizhou Engineering Research Center for Fruit Processing, Guiyang 550005; Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008)

Abstract: A rapid enrichment method based on macroporous adsorption resin, and preparative high performance liquid chromatography (pre-HPLC) method was developed for the separation of chlorogenic acid from the stems of *Ficus tikoua* Bur.. Among AB-8, D101, HPD600, CN206 and NKA-II five resins, the static adsorption-desorption experiments showed that NKA-II macroporous resin had good adsorption ratio and desorption ratio for the target compound. The target compound was eluted with 4 bed volume (BV) of 5% (V/V) ethanol to remove impurities, and eluted with 7 BV of 10% (V/V) ethanol for enrichment with NKA-II macroporous resin. The peak area ratio of the target compound was 80.8% by HPLC. The target compounds were further purified by preparative HPLC, and the separation mode of repeated injection was developed, which could improve the separation efficiency. The purity of the target compound was 98.6% after purification, which was identified as chlorogenic acid by ¹H NMR and ¹³C NMR. The developed procedure is suitable for large-scale preparation of chlorogenic acid from *Ficus tikoua* Bur.

Keywords: *Ficus tikoua* Bur. stems; chlorogenic acid; rapid separation; macroporous absorption resin; preparative high performance liquid chromatography (pre-HPLC)

收稿日期: 2021-02-03

基金项目: 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字 [2017]244)、贵阳市财政支持贵阳学院学科建设与研究生教育项目(SY-2020)和贵州省教育厅高等学校拔尖人才计划(黔教合 KY 字 [2019]066 号)资助

作者简介: 刘永玲, 女(1985-), 硕士, 实验师。研究方向: 药食两用资源, leini212@163.com

*通信作者: 谢国芳, 男(1987-), 博士, 副教授。研究方向: 农产品储运与加工, gfxie@gyu.edu.cn

野地瓜(*Ficus tikoua* Bur.)又名过山龙、地果、地瓜藤等,为药食两用资源,是独具特色的地方中草药^[1-2]。野地瓜全株富含三萜类、黄酮类、酚酸类等成分^[3],本课题组^[4]前期已利用在线高效液相色谱-质谱-二苯基三硝基苯肼(HPLC-DAD-ESI/MSⁿ-DPPH)技术在线筛选出野地瓜茎正丁醇相中一具有抗氧化成分的化合物,并初步鉴定为绿原酸成分。目前关于野地瓜中化学成分分离的报道有限,且都采用传统柱色谱方法^[5-7],尚未有关于野地瓜中绿原酸成分的分离纯化及鉴定报道。

绿原酸是分布于植物中常见的一种酚酸类化合物,具有抗炎、抗菌等生理功能^[8],是天然药物中发挥药物活性的功效成分之一,近年来在食品、化妆品和医药领域有很大的应用价值^[9-11],因此制备出高纯度的绿原酸化合物具有重要的意义。大孔树脂已被广泛应用于天然产物中目标化合物的富集^[12],但制备出高纯度的化合物仍需要其他高效制备分离技术。制备液相色谱法是近年来应用较广的用于分离天然产物成分的色谱技术,具有在线监测、高效分离、自动控制的优点^[13-14],且具有正向^[15]、反相^[16]、排阻^[17]、离子交换^[18]等多种分离模式,可适用于各种化合物的纯化。因此基于大孔树脂和制备液相色谱可建立目标化合物的快速富集和分离制备工艺。

本研究建立了基于大孔吸附树脂快速富集、制备高效液相色谱高效分离野地瓜茎中绿原酸的制备方法,为野地瓜中绿原酸单体化合物的开发利用提供技术依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC 3200型高效液相色谱仪(安徽皖仪公司),配备DAD 3200紫外可见光二极管阵列检测器,P3200Q泵,CT 3200柱温箱,AS 3200自动进样器;Piatasil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm)(北京迪科马科公司);LC-8A型制备高效液相色谱仪(日本岛津公司),配备SPD-20A紫外可见光检测器;Hedera ODS-2(10 mm×250 mm 5 μm)(江苏汉邦科技公司);GLZY-0.5B冻干机(上海浦东冷冻干燥设备公司);R-1001VN型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸公司);Varian Mercury-600B核磁共振仪(美国Varian公司)。乙腈(色谱纯)、乙醇(AR)、HCl;AB-8,D101,HPD600,CN206,NKA-II型大孔吸附树脂(沧州宝恩吸附材料公司)。

1.2 样品制备

(C)1994-2024 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

20 L 65% (V/V) 的乙醇,于75℃下回流提取3次,每次2 h,过滤,合并提取液,于75℃下减压浓缩至无醇味,得浸膏,经冷冻干燥得到308 g粗提物。将粗提物用2 L蒸馏水溶解,依次用石油醚和乙酸乙酯萃取至萃取液无色,将萃取水相旋转蒸发浓缩得浸膏,经冷冻干燥得水相180.0 g。

1.3 HPLC 检测条件

色谱柱: Piatasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.2% (V/V) 冰乙酸溶液(B), 梯度洗脱: 0~15 min: 10%~32% A; 15~15.1 min: 32%~10% A; 15.1~20 min: 10% A。流速1.0 mL/min; 检测波长300 nm; 柱温: 25℃。

1.4 大孔吸附树脂富集目标化学成分

1.4.1 大孔树脂的预处理 先用95% (V/V) 乙醇将选定的5种大孔树脂(AB-8,D101,HPD600,CN206和NKA-II)浸泡24 h,用纯水洗脱至无醇味。然后依次用4% (V/V) HCl溶液、纯水和4% NaOH溶液各清洗1次,最后用纯水冲洗至流出液pH为中性后将树脂晾干备用。

1.4.2 吸附率、解析率计算 分别称取预处理后的5种大孔吸附树脂2.0 g(去除水分后的干树脂计算),置于50 mL具塞圆底瓶中,分别加入野地瓜茎水相溶液(15 mg/mL) 20 mL,密封,于25℃恒温摇床中以140 r/min静态吸附12 h,过滤,定容至25 mL,测定反应前后目标化合物的峰面积,按式(1)计算吸附率。过滤后,干燥树脂,收集备用。将静态吸附后得到的5种树脂分别置于50 mL具塞圆底瓶中,各加90% (V/V) 乙醇溶液25 mL,密封,于25℃恒温摇床中以140 r/min解析12 h,过滤,定容至25 mL,测定溶液中目标化合物的峰面积,按式(2)计算解析率。

$$E = (L_1 - L_2) / L_1 \times 100\% \quad (1)$$

其中: E 为吸附率; L_1 为吸附前样品溶液中目标化合物峰面积; L_2 为吸附后溶液中目标化合物峰面积。

$$M = L_3 / (L_1 - L_2) \times 100\% \quad (2)$$

其中: M 为解析率; L_1 为吸附前样品溶液中目标化合物峰面积; L_2 为吸附后样品溶液中目标化合物峰面积; L_3 为解吸附后溶液中目标化合物峰面积。

1.4.3 大孔树脂分离条件优化

1.4.3.1 不同pH上样液 分别称取5份1.4.2节条件下优选出来的树脂2.0 g,置于50 mL具塞圆底瓶中,分别加入pH为1,2,3,4,5,6,7的野地瓜茎水相溶液(15 mg/mL) 20 mL,密封后于25℃恒温摇床中以140 r/min静态吸附12 h,测定反应

前后目标化合物的峰面积 绘制曲线。

1.4.3.2 吸附时间 取 1.4.2 节选择出来的最佳树脂 7 份,每份 2.0 g,分别置于 50 mL 具塞圆底瓶中,分别加入野地瓜茎水相溶液(15 mg/mL) 20 mL,密封后于 25℃ 恒温摇床中以 140 r/min 静态吸附,分别在 1 2 3 4 5 6 7 h 测定反应前后样品溶液中目标化合物的峰面积 绘制曲线。

1.4.3.3 乙醇浓度和洗脱体积 将 1.4.2 节选择出来的最佳树脂湿法装柱(80 cm × 2.5 cm),进行动态吸附分离,柱体积为 180 mL,注入野地瓜茎水相溶液 80 mL(15 mg/mL) 上柱,按 1.4.3.2 节方法优选出的吸附时间静置后,依次用 5 倍柱体积(BV)的水和 5%、10%、15%、20%、25%、30%(V/V)的乙醇洗脱,收集每个洗脱体积的洗脱液,HPLC 测定目标化合物峰面积 绘制洗脱曲线。

1.5 目标化合物的纯化与鉴定

1.5.1 制备高效液相色谱条件 Heder ODS-2 (10 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 乙腈(A) — 0.2%(V/V) 冰乙酸(B): 0 ~ 16 min, 17% A 等度洗脱; 流速: 4.7 mL/min; 检测波长: 300 nm; 进样量: 1 mL; 进样次数 5 次; 进样间隔 1.8 min。

1.5.2 目标化合物结构鉴定 用 HPLC 检测制备高效液相色谱分离得到的目标化合物,其纯度根据面积归一化法来确定,紫外、核磁共振 H 谱、C 谱鉴定其结构。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择 分别选用甲醇-水、甲醇-0.1%(V/V) 冰乙酸、甲醇-0.2%(V/V) 冰乙酸、乙腈-水、乙腈-0.1%(V/V) 冰乙酸,当采用乙腈-0.2%(V/V) 冰乙酸进行梯度洗脱时,目标化合物可以实现较好的基线分离 结果见图 1。

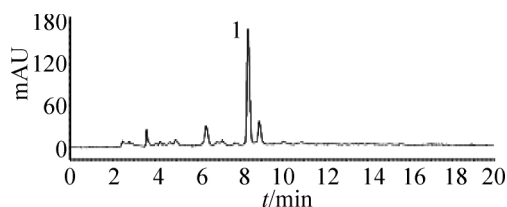


图 1 野地瓜茎提取物的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of the stems extract of *Ficus tikoua* Bur.

1 is the target compound

2.2 树脂筛选分析 5 种树脂对目标化合物的静态吸附-解吸附见图 2,由图可知,CN206,NKA-II 型树脂对目标化合物的静态吸附率均 >80% 吸附率相对较好分别为 80.2% 和 83.5%,差异不显著

($P > 0.05$)。分析原因可能为 CN206,NKA-II 型树脂均为极性树脂,其特殊的空间结构可以与目标化合物有更好的吸附富集效果; AB-8,D101 型树脂对目标化合物的吸附率较低。从图 2 不同树脂对目标化合物的解析率得知 NKA-II 型树脂对目标化合物的解析率(92.2%) 明显高于 CN206 型树脂(86.1%),因此选用 NKA-II 型树脂进行后续目标化合物的分离纯化。

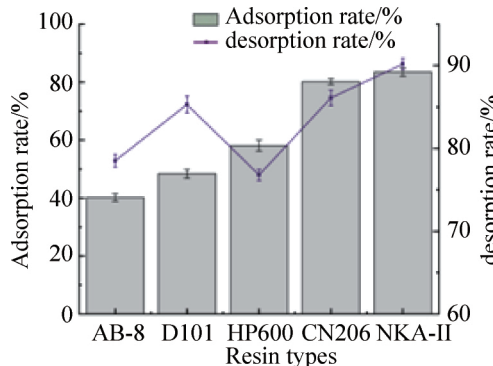


图 2 5 种树脂对目标化合物的吸附率与解析率的考察

Fig. 2 Adsorption ratio and desorption ratio of target compound on different macroporous resins

2.3 NKA-II 型大孔树脂对目标化合物分离条件的优化

2.3.1 上样液 pH 对 NKA-II 型树脂吸附目标化合物的影响 上样液 pH 的不同对大孔树脂的吸附纯化效果起到至关重要的作用。由实验结果可知,当上样液 pH 3 时 NKA-II 型树脂对目标化合物具有最好的吸附率,比中性时可提高 8%。这与尹佳乐等^[19]报道的 NKA-9 型树脂富集绿原酸时最佳的上样液 pH 3,与李华生等^[20]报道的 D101B 型树脂富集绿原酸时最佳的上样液 pH 3,与袁晓庆等^[21]报道的 LX-218 型树脂上样液 pH 3 时对绿原酸的吸附率最高的结果一致。由此可推断咖啡酰奎宁酸在 pH 3 时最稳定,其酚羟基结构以分子状态存在,可凭借范德华力增加吸附效果。

2.3.2 吸附时间对 NKA-II 型树脂吸附目标化合物的影响 由实验结果可知,随着吸附时间的加长,NKA-II 型大孔树脂对目标化合物的吸附能力逐渐升高,当吸附时间超过 5 h 时,目标化合物在样品溶液中的峰面积略有降低,但差别不大,因此优选出的最佳吸附时间为 5 h。本研究对吸附时间的优化,目的在于可节省生产中对目标化合物的富集工艺时间,降低成本。

2.3.3 洗脱浓度 由实验结果可知,经水和 5%,

10%, 15%, 20%, 25%, 30% (V/V) 乙醇洗脱,目标化

合物主要分布在 10% 乙醇中, 经 HPLC 检测目标化合物峰面积占比为 72.85%。在 5% 乙醇和 15% 乙醇中峰面积占比分别为 8.45% 和 14.50%, 其他浓度下目标化合物峰面积比很小, 可忽略不计。

2.3.4 洗脱体积 按照 1.4.3.3 节方法上样, 经 HPLC 分析显示, 目标化合物主要分布在 10% 乙醇、5% 乙醇第 5 个洗脱体积和 15% 乙醇第 1 个洗脱体积中。由图 3 曲线 1 可知, 当用 5% 乙醇时, 洗脱体积由 4 BV - 5 BV 时, 目标化合物峰面积增加明显, 因此后续试验考虑选用 4 BV 的 5% 乙醇洗脱去除干扰杂质; 由图 3 曲线 2 可知, 用 10% 乙醇来洗脱富集目标化合物时, 洗脱至 7 BV 后, 曲线趋于平缓, 表明目标化合物已基本被洗脱出来。因此, 先用 5% 乙醇洗脱 4 BV, 去除干扰杂质后, 应用 7 BV 10% 乙醇洗脱富集目标化合物。

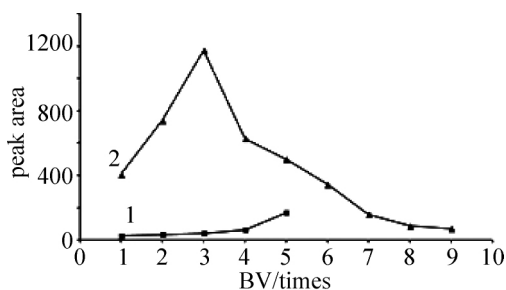


图3 不同柱体积对目标化合物的洗脱曲线

Fig. 3 Elution curves of target compound with different column volumes

1 - ethanol concentration of 5%; 2 - ethanol concentration of 10%

2.4 大孔树脂富集目标化合物

取萃取水相 150 g, 用 2 L 去离子水溶解, 过滤, 注入到玻璃柱中 (150 cm × 5 cm 2 kg NKA - II 树脂), 吸附 5 h。先用 5% (V/V) 乙醇洗脱 4 BV, 去除干扰杂质, 再用 10% (V/V) 乙醇洗脱 7 BV, 得到富含目标化合物的组分, 用旋转蒸发器浓缩至无醇味, 冷冻干燥得 6.8 g。HPLC 分析如图 4 所示, 目标化合物峰面积占比达到 80.8%。

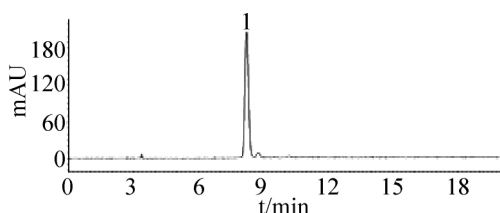


图4 优化洗脱条件后的目标化合物

Fig. 4 The target compound was obtained at optimized elution conditions

2.5 制备液相色谱对目标化合物的分离制备

2.5.1 流速 制备液相色谱纯化目标化合物的理论最佳流速可根据公式(3)计算。

$$V = V_1 \times (D_1/D_2)^2 \quad (3)$$

其中: V 为制备液相色谱的流速; V_1 为分析型高效液相色谱仪的流速; D_1 为制备液相色谱柱的直径; D_2 为高效液相色谱柱的直径。根据公式计算出制备液相色谱仪的理论流速为 4.7 mL/min, 故本研究采用的流速为 4.7 mL/min, 并在此流速基础上进行其他条件的优化。

2.5.2 洗脱浓度 根据高效液相色谱仪对目标化合物的分析条件, 可计算出目标化合物在 8.2 min 时被 22% 乙腈洗脱。因此, 首先选择 22% 乙腈进行等度洗脱。结果发现, 出峰时间太快, 目标化合物不能与干扰杂质实现分离。因此, 本研究通过逐渐降低乙腈浓度的方法进行试验。研究发现, 当乙腈体积分数低于 17% 时, 目标化合物可与干扰杂质实现较好的基线分离。但乙腈浓度越低, 洗脱时间越长。因此, 本研究最终采用 17% (V/V) 乙腈进行等度洗脱, 结果如图 5。

2.5.3 进样模式 由图 4 可知, 富集组分中只含有目标化合物与 1 个干扰杂质。因此, 可开发重复进样模式, 提高分离效率。重复进样的关键在于选择重复进样的时间间隔, 时间太短会造成峰的重叠, 时间太长则重复进样无意义。由图 5 可知, 目标化合物与干扰杂质的峰宽为 1.8 min, 因此进样的时间间隔应大于等于 1.8 min, 为保证分离效率, 进样间隔确定为 1.8 min, 可保证连续出峰。合并连续进样模式下的 1 号峰, 从 40.0 mg 2.4 节大孔树脂富集物中得到目标化合物 28.8 mg, 经 HPLC 检测目标化合物的纯度达 98.6%。

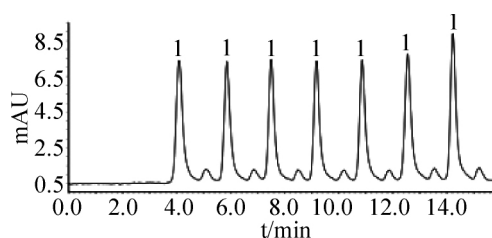


图5 目标组分的制备液相色谱图

Fig. 5 Preparative liquid chromatogram of target component

1 - the target compound

2.6 结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ : 7.417 (1H, td, $J = 15.6$ Hz, H -

7') , 7.033 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2') , 6.980 (1H, dd, J = 8.4 Hz, H-6') , 6.766 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5') , 6.145 (1H, d, J = 16.2 Hz, H-8') , 5.069 (1H, dd, J = 10.8 Hz, H-3) , 3.925 (1H, m, H-5) , 3.565 (1H, dd, J = 7.2 Hz, H-4) , 2.014 (1H, m, H-2b) , 1.942 (1H, m, H-6) , 1.782 (1H, m, H-2a) . ¹³C - NMR (DMSO-d₆, 150 MHz) δ: 174.9 (C-7) , 165.7 (C-9') , 148.3 (C-4') , 145.5 (C-3') , 144.9 (C-7') , 125.6 (C-1') , 121.3 (C-6') , 115.7 (C-5') , 114.7 (C-2') , 114.3 (C

-8') , 73.4 (C-1) , 70.9 (C-5) , 70.3 (C-4) , 68.0 (C-3) , 37.2 (C-2) 。以上数据与文献报道^[22-23]的绿原酸数据基本一致。

3 结论

建立了基于大孔吸附树脂快速富集、制备高效液相色谱高效分离的野地瓜茎中绿原酸的制备方法。此外开发了基于制备液相色谱技术的重复进样模式,提高了分离效率。该方法快速、简单、易于放大,适于野地瓜中绿原酸化合物的大规模制备,也为后期绿原酸化合物的活性筛选奠定基础。

参考文献

- [1] Wei S P, Wu W J, Ji Z Q. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 7375.
- [2] Guo L J, Tan X Q, Zheng W, Kong F F, Lu P, Ni D J. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2011, 42(9): 1709. 郭良君, 谭兴起, 郑巍, 孔飞飞, 陆萍, 倪东杰. *中草药*, 2011, 42(9): 1709.
- [3] Fu G M, Li W J, Huang X Z, Zhang R Z, Tian K, Hou S Q, Li Y K. *Nat Prod Res*, 2018, 32(4): 399.
- [4] Liu Y L, Ye S F, Yang Y. Fang L H, Zhao Z B, Xie G F. *Food Mach*, 2020, 36(6): 176. 刘永玲, 叶思帆, 杨怡, 方丽红, 赵治兵, 谢国芳. *食品与机械*, 2020, 36(6): 176.
- [5] Tian M Y, Liu T T, Hong Y, Peng L J, Xiong F, Zhou Y. *Chin Med Mat*, 2018, 41(9): 2120. 田民义, 刘婷婷, 洪怡, 彭礼军, 熊飞, 周英. *中药材*, 2018, 41(9): 2120.
- [6] Tian M Y, Peng L J, Feng T T, Chen L, Zhou Y. *J Mt Agri Biol*, 2014, 33(2): 89. 田民义, 彭礼军, 俸婷婷, 陈琳, 周英. *山地农业生物学报*, 2014, 33(2): 89.
- [7] Guan Y X, Yang X S, Tong L H, Yang B, Hao X J. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2007, 38(3): 342. 关永霞, 杨小生, 佟丽华, 杨波, 郝小江. *中草药*, 2007, 38(3): 342.
- [8] Dima C, Dima S. *J Microencapsul*, 2018, 35(6): 1.
- [9] Lou Z X, Wang H X, Zhu S, Ma C Y, Wang Z P. *J Food Sci*, 2011, 76(6): 398.
- [10] Dai G L, Ma S T, Liu S J, Chen X G, Zang Y X, Ju W Z, Tan H S. *China J Chin Mater Med*, 2013, 38(21): 3753. 戴国梁, 马世堂, 刘史佳, 程小桂, 臧雨馨, 居文政, 谈恒山. *中国中药杂志*, 2013, 38(21): 3753.
- [11] Xu J G, Hu Q P, Liu Y. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(46): 11625.
- [12] Xu D D, Zhang W B, Yang R J, Zhao W, Hua X. *Food Mach*, 2015, 31(5): 210. 徐丹丹, 张文斌, 杨瑞金, 赵伟, 华霄. *食品与机械*, 2015, 31(5): 210.
- [13] Li L X, Li J, Wang Y M, Zhang L Y, Li Y B. *Cent South Pharm*, 2012, 10(3): 209. 李利新, 李锦, 王玉明, 张丽媛, 李遇伯. *中南药学*, 2012, 10(3): 209.
- [14] Li S C, Wang W W, Tang H, Chen K, Yang J H, He L H, Ye H Y, Peng A H, Chen L J. *J Chromatogr A*, 2014, 1344: 51.
- [15] Dousa M, Lehnert P, Adamusová H, Bosáková Z. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 74: 111.
- [16] Yu W Y, Jin H L, Shen A J, Deng L, Shi J L, Xue X Y, Guo Y D, Liu X F, Liang X M. *J Chromatogr B*, 2017, 1040: 47.
- [17] Berek D. *J Sep Sci*, 2010, 33(3): 315.
- [18] Nguyen N T T, Lee J S, Yun S, Lee E K. *J Chromatogr A*, 2016, 1457: 88.
- [19] Yin J L, Chen Y, Zhang H Y. *China Food Addit*, 2020, 31(11): 67. 尹佳乐, 陈越, 张海悦. *中国食品添加剂*, 2020, 31(11): 67.
- [20] Li H S, Zhou Z H, Chen Y. *Chem World*, 2020, 61(11): 760. 李华生, 周振华, 陈瑛. *化学世界*, 2020, 61(11): 760.
- [21] Yuan X Q, Li L, Liu Y J, Wang Z. *J Anhui Agric Sci*, 2020, 48(4): 168. 袁晓庆, 李莉, 刘言娟, 王振. *安徽农业科学*, 2020, 48(4): 168.
- [22] Wang D J, Du N, Wen L, Zhu H, Liu F, Wang X, Du J H, Li S B. *Molecules*, 2017, 22(2): 1.
- [23] Shi B Y, Li J Y, Zhou Q, Zhu L N, Lu Y. *Food Sci*, 2013, 34(13): 87. 石伯阳, 李佳银, 周桥, 朱丽娜, 陆英. *食品科学*, 2013, 34(13): 87.